

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication : **2 574 089**
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

(21) N° d'enregistrement national : **84 18393**

(51) Int Cl⁴ : C 12 P 7/64; A 61 K 31/20 // (C 12 P 7/64,
C 12 R 1:90).

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 3 décembre 1984.

(30) Priorité :

(43) Date de la mise à disposition du public de la
demande : BOPI « Brevets » n° 23 du 6 juin 1986.

(60) Références à d'autres documents nationaux appa-
rentés :

(71) Demandeur(s) : INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET
DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM). — FR et
UNIVERSITE CATHOLIQUE DE LOUVAIN et FACULTE
DES SCIENCES AGRONOMIQUES DE L'ETAT DE GEM-
BLOUX. — BE.

(72) Inventeur(s) : Raymond Devis, Rachad Saliba, Philippe
Thonart, Claude Artois, Daniel Dive et Jean Guillaume.

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire(s) : Marc-Roger Hirsch.

(54) Procédé de production d'acides gras, en particulier d'acide γ -linoléique à partir de tétrahyména, produits obtenus et
préparation médicamenteuse ou alimentaire contenant de l'acide γ -linoléique ou ses dérivés en tant qu'agent anti-
agrégation plaquettaire.

(57) Procédé de production d'acides gras caractérisé en ce
qu'il comporte au moins les étapes de :

- production des protozoaires ciliés *Tetrahymena* dans un
milieu nutritif adéquat et,
- l'extraction des acides gras totaux de *Tetrahymena*.

L'invention porte aussi sur les acides gras totaux ainsi
obtenus, ainsi que sur l'acide γ -linoléique ou l'acide dihomog-
linoléique et leurs dérivés ainsi que sur des préparations
médicamenteuses ou alimentaires en contenant, à titre d'agent
d'antiagrégation plaquettaire ou antithrombotique.

FR 2 574 089 - A1

1

PROCÉDÉ DE PRODUCTION D'ACIDES GRAS, EN PARTICULIER
D'ACIDE γ -LINOLÉNIQUE À PARTIR DE TETRAHYMENA, PRODUITS
OBTENUS ET PRÉPARATION MÉDICAMENTEUSE OU ALIMENTAIRE
CONTENANT DE L'ACIDE γ -LINOLÉNIQUE OU SES DÉRIVÉS EN
05 TANT QU'AGENT ANTI-AGREGATION PLAQUETTAIRE.

La présente invention repose sur une étude approfondie de la biochimie et du métabolisme des prostaglandines chez les vertébrés supérieurs-dont l'Homme-qui a conduit à admettre la possibilité du caractère non physiologiques des prostaglandines. Celles-ci semblent n'avoir aucun rôle spécifique; elles agiraient principalement par un mimétisme inutile des hormones protidiques et certaines d'entre elles sont même dangereuses pour l'organisme, notamment la plupart de celles issues de
10 l'acide arachidonique, dont surtout les endoperoxydes PGG₂ et PGH₂ et la thromboxane TxA₂, un de leurs métabolites, responsable d'une agrégation plaquettaire irréversible.

Or, les prostaglandines ont des précurseurs essentiels
20 essentiellement alimentaires et donc fortuits. On peut, en principe, régler leur présence qualitative et quantitative dans l'organisme par la seule alimentation. L'absence d'acide arachidonique dans l'alimentation pourrait ainsi, théoriquement, empêcher la présence des prostaglandines dangereuses, et de leurs produits d'accompagnement.
25

Cependant, l'on observe que l'acide linoléique ou cis-9,12-octadécadiénoïque est lui-même transformé par l'organisme en acide arachidonique. Or, quel que soit le
30 régime alimentaire envisagé, il est pratiquement impossible d'en éliminer toute trace d'acide linoléique, qui est d'ailleurs un acide gras "essentiel".

Le but poursuivi par la présente invention est donc de chercher un moyen de neutraliser les dangereux
35 effets de l'acide arachidonique, dont un excès peut être responsable d'agrégaions plaquettaires irréversibles et donc de thromboses vasculaires et d'infarctus.

Les expériences de WILLIS et coll. - Prostaglandins, VIII, 509, 1974, avaient montré, chez le rat Wistar et chez le lapin New Zealand (mais non chez l'Homme), qu'un régime exempt d'acide arachidonique et riche en acide dihomog- γ -linolénique ou cis-8,11,14-eicosatriénoïque empêche l'agrégation plaquettaire. Malheureusement, ce dernier acide gras est extrêmement rare dans la nature et sa synthèse elle-même est difficile et très coûteuse (Samuelsson, dans Lipid Metabolism, ed. Wakil, S.J., Acad. Press, New York, London, p.131, 1970).

Il est apparu que le but visé par l'invention peut être atteint par un procédé caractérisé en ce qu'il comporte au moins les étapes de culture en masse de protozoaires ciliés Tetrahymena dans un milieu adéquat et l'extraction des acides gras totaux desdits Tetrahymena. Ces acides gras ne contiennent aucun individu toxique et peuvent être facilement identifiés et dosés.

Les acides gras de Tetrahymena sont caractérisés par leur richesse en acide γ -linolénique ou cis-6,9,12-octadécatriénoïque qui constitue, selon les souches et les conditions de culture 20 à 45% en poids des acides gras totaux et par la présence, entre autres, des acides oléique et ciliénique qui constituent, respectivement et selon les souches et les conditions de culture, 1 à 15% et 1 à 10% en poids des acides gras totaux.

L'hydrolyse acide des cellules de Tetrahymena, suivie d'une saponification, d'une élimination des l'insaponifiable et d'une acidification, permet d'obtenir une huile légèrement jaunâtre qualifiée de "huile de Tetrahymena" dont les propriétés d'anti-agrégation plaquettaire ont été testées et quantifiées sur une série de plasmas humains de sujets jeunes (de 25 à 35 ans) du sexe masculin.

Les résultats ont montré que cette "huile de Tetrahymena" est effectivement un agent d'anti-agrégation plaquettaire très actif.

De même, l'acide γ -linolénique, seul, présente un

effet d'anti-agrégation plaquettaire relativement moins puissant que celui du "l'huile de Tetrahymena" dont il constitue l'élément principal sur le plan quantitatif.

Le mécanisme de cet effet anti-agrégant de l'acide de γ -linoléique, n'a pas encore été élucidé. À titre d'hypothèse, l'acide γ -linoléique agit en se transformant instantanément en acide dihomog γ -linoléique, dont l'effet antiagrégant est connu. Ou bien il intervient lui-même directement dans les synthèses de prostaglandines.

D'autre part, un certain effet de synergie est probablement obtenu par l'utilisation de l'acide γ -linoléique avec d'autres acides gras contenus dans l'huile de Tetrahymena, vraisemblablement, l'acide oléique et/ou ciliénique.

Ceci expliquerait l'effet anti-agrégant plus puissant de l'huile de Tetrahymena.

Il reste à souligner que l'huile de Tetrahymena est inoffensive: cette huile peut constituer un aliment ou un additif alimentaire dont l'action anti-agrégante s'oppose ainsi à celle, toujours dangereuse à la longue, des anti-agrégants "médicamenteux", comme l'aspirine et les corticoïdes.

Parmi les souches de Tetrahymena, dont on disposait celle de T.rostrata a été préférée du fait qu'elle présente, dans le milieu lait écrémé-levure ou extrait de levure utilisé, la croissance la plus rapide.

Selon l'invention, la production de Tetrahymena s'effectue en fermenteur.

Le milieu de culture préféré est constitué de lait écrémé et de levure ou d'extrait de levure.

Les conditions opératoires préférées pour une transposition à l'échelle industrielle sont :

- pH = 5.5 à 7.0
- Température : fixée ou variable entre 25 et 30°C, avec chute éventuelle à des températures plus basses au début de la phase stationnaire de croissance.

- Concentration initiale en poudre de lait écrémé : 1 à 3% (poids/volume)
- Concentration initiale en levure : 1 à 2,5% (poids/volume)
- 05 - Concentration initiale en extrait de levure : 0,5 à 1%
- Débit d'air stérile : 1 volume/minute/volume de milieu
- Vitesses périphériques des turbines variables selon la concentration en O₂ dissous. Cette vitesse est augmentée si la concentration en O₂ dissous devient inférieure à 40% de sa valeur à la saturation (fixée en absence de Tetrahymena).
- 10

L'invention concerne donc également les produits résultant du procédé précité et des préparations médicamenteuses ou alimentaires, notamment à usage diététique, contenant au moins de l'acide γ -linoléique sous forme d'acide libre ou sous forme d'un dérivé notamment sous forme d'un ester, de préférence sous forme d'un ester méthylique.

Lesdites préparations médicamenteuses ou alimentaires peuvent contenir soit directement le produit d'extraction qualifié d'huile de Tetrahymena, soit un ou plusieurs des constituants de cette huile, à savoir au moins l'acide γ -linoléique ou un dérivé de celui-ci et éventuellement d'autres constituants exerçant un effet antiagrégation plaquettaire ou d'autres effets.

On entend par dérivé de l'acide γ -linoléique également l'acide dihomog γ -linoléique et ses esters.

L'intégralité des différents acides gras peuvent être utilisés sous forme de dérivés, tels que des esters d'acides gras, en particulier les esters méthyliques.

La préparation des dérivés d'acides gras s'effectue par les procédés classiques de synthèse organique et, dans le cas particulier de la formation d'un ester par les techniques classiques d'esterification.

Les préparations médicamenteuses ou alimentaires peuvent bien entendu contenir d'autres constituants, notamment des adjuvants utiles pour l'activité souhaitée

tels que la vitamine E (acétate d' α -tocophérol).

Lorsque les préparations médicamenteuses selon l'invention sont présentées sous forme de compositions pharmaceutiques elles peuvent aussi contenir d'autres substances actives utilisables dans les compositions pharmaceutiques pour la prévention ou le traitement des affections résultant des phénomènes d'agrégation plaquettaire.

Habituellement, elles contiennent également des additifs de formulation permettant de les administrer commodément. Ces additifs peuvent être des supports ou des agents auxiliaires pharmaceutiques, solides ou liquides, organiques ou inorganiques, appropriés tels que l'eau, les solvants organiques de type paraffinique, la gélatine, le lactose, l'amidon, le stéarate de magnésium, le talc, des graisses et huiles végétales et animales adéquates, la gomme, les polyalkyléneglycols ou des liants et autres agents habituels.

Les compositions pharmaceutiques selon l'invention contiennent en général au moins 30% en poids d'acide γ -linoléique ou l'équivalent de ses dérivés et éventuellement des substances adjuvantes.

Parmi les modes d'administration pouvant convenir, l'administration par voie orale, est préférée.

Du fait que les acides gras utilisés, constituent des aliments, il n'existe pas, en dehors de considérations diététiques, de doses maximales. Dans les proportions habituelles d'un régime alimentaire, on n'observe pas de toxicité.

Dans une thérapie faisant appel à un traitement continu, les gélules ou capsules peuvent être la forme appropriée de préparation pharmaceutique en raison des effets de longue durée ou d'effet retard obtenus lorsque le médicament est administré par voie orale.

Les dites compositions pharmaceutiques selon l'invention peuvent être administrées en médecine humaine par voie orale en unités de dosage contenant plus de

20% en poids d'acide γ -linolénique ou l'équivalent de ses dérivés, avec un support non toxique acceptable en pharmacie.

Par "unité de dosage", on entend une dose unitaire qui peut être administrée à un patient et peut facilement être manipulée et conditionnée, en restant sous forme d'une dose unitaire physiquement stable, comprenant l'ingrédient actif soit seule, soit en mélange avec des diluants ou supports pharmaceutiques solides ou liquides.

Sous la forme d'unités de dosage, les compositions pharmaceutiques selon l'invention peuvent être administrées une à plusieurs fois par jour, à intervalles appropriés, mais toujours selon l'état du patient et en fonction des prescriptions du médecin. La dose journalière appropriée des compositions selon l'invention varie en général de 20 mg à 150 mg par kg de poids corporel.

À titre d'illustration sans caractère limitatif, l'invention sera décrite plus en détail à l'aide des exemples qui suivent.

Exemple 1 : Production d'acides gras au départ de Tetrahymena.

- Souche : La souche de Tetrahymena rostrata a été fournie par Mme Fryd-Versavel (Université de Paris XI, Orsay, France).

- Milieu de culture : Composé (poids/volume) de 0,5% d'extrait de levure (Difco) et de 1% de lait écrémé en poudre (Régilait) dans de l'eau. L'addition d'un supplément de lait (fed batch) est effectuée s'il y a lieu, à partir d'une boîte stérile de lait écrémé en poudre.

A. Description et principes de fonctionnement des fermenteurs :

On dispose de fermenteurs (Biolafitte de 20 et de 100 litres en acier inoxydable dont les caractéristiques dimensionnelles sont les suivants :

- fermenteur de 20 litres : fond plat ; cuve 22

7

cm de diamètre et de 55 cm de hauteur ; quatre chicanes (contrepales) perpendiculaires de 49 cm de hauteur et de 3,2 cm de largeur ; deux turbines à disque à 4 pales radiales : élévation du centre du disque de la première turbine par rapport au fond de la cuve 4,5 cm, hauteur séparant les deux turbines 11 cm, largeur des pales 2 cm, longueur des pales 2 cm, diamètre des disques 5,9 cm, diamètre des turbines 8 cm ;

- fermenteur de 100 litres : fond plat ; cuve de 43 cm de diamètre et de 78 cm de hauteur ; deux chicanes perpendiculaires de 58,5 cm de longueur et de 5,8 cm de largeur ; deux turbines à disque à 4 pales radiales : élévation du centre du disque de la première turbine par rapport au fond de la cuve 4,2 cm, hauteur séparant les deux turbines 17 cm, largeur des pales 2,5 cm, longueur des pales 3,5 cm, diamètre des disques 8,9 cm, diamètre des turbines 12,9 cm ;

La partie active des filtres d'air est une cartouche en acier inoxydable fritté d'une épaisseur de 2 mm. L'air stérile est introduit à la base des fermenteurs par l'intermédiaire d'un sparger rotatif solidaire de l'arbre d'agitation (figure 32). Les fermenteurs sont munis de systèmes automatiques de régulation, d'enregistrement et d'affichage digital du pH, de la température et de la vitesse d'agitation (en fonction de la concentration en O_2 dissous). Un ordinateur (Hewlett-Packard 9826 ; imprimante : Hewlett-Packard 2671G ; Interface ; Hewlett-Packard 6942A Multiprogramme) permet aussi la régulation, l'enregistrement et l'affichage de ces différents paramètres.

- La mesure du pH se fait par un pH-mètre (Tacussel) relié à une sonde stérilisable (Ingold) pressurisée à l'air comprimé. Des tampons, à pH 4 et 7, servent à l'étalonnage. Pour le réglage du pH, à la valeur désirée, des solutions de H_2SO_4 2N reliées aux fermenteurs par l'intermédiaire de pompes péristaltiques à vitesse variable.

- L'O₂ dissous est mesuré par l'intermédiaire d'une sonde galvanique stérilisable (Biolafitte, modèle G2L). L'O₂ dissous est exprimé en pour cent : le 100% correspond à un milieu saturé en O₂ en l'absence du
05 Tetrahymena.

- La mesure de la température se fait par une sonde en platine (Biolafitte). La régulation de la température est assurée par une circulation d'eau thermostatée dans un échangeur formé par un tube aplati en
10 acier inoxydable immergé dans le milieu de culture.

Un récipient de liquide anti-mousse (Antifoam Emulsion, Sigma n° A.5758) est relié au fermenteur de 100 litres par l'intermédiaire d'une pompe péristaltique qui se met en fonctionnement dès que la mousse entre en
15 contact avec un électrode réglable en hauteur. Pour le fermenteur de 20 litres, le liquide anti-mousse est ajouté mécaniquement. D'autre part, un appareil (Funda), fixé sur la platine supérieure du fermenteur de 20 litres, assure le pompage et la cassure des mousses
20 grâce à ses disques tournants.

B. Stérilisation : La stérilisation des fermenteurs contenant les milieux de culture est effectuée à 110-115°C pendant 30 minutes sous agitation. La stérilisation se fait à la vapeur, d'une façon indirecte jusqu'à 100°C, puis au-delà, avec une légère admission de
25 vapeur par le diffuseur d'air pour compenser l'évaporation et stériliser le dispositif d'étanchéité de l'arbre d'agitation et le circuit d'arrivée d'air stérile. Toutes les canalisations de raccordement sont stérilisées
30 en laissant fuser la vapeur par les purgeurs. La vapeur est introduite directement à contre-courant dans les filtres à air;

Pour les cultures en Erlenmeyer, les milieux sont stérilisés par autoclavage à 110-115°C pendant 30 minutes.
35 tes.

La solution aqueuse d'H₂SO₄2n (voir plus loin) contenue dans un Erlenmeyer est stérilisé par autoclava-

ge à 120-125°C pendant 20 minutes.

C. Cultures en Erlenmeyer : ces cultures sont effectuées à $28 \pm 1^\circ\text{C}$ dans le milieu base ; le volume occupé par le milieu étant inférieur à 15% du volume total de l'étalonnage.

E. Extraction des acides gras et analyse par GLC: Un culot sec de Tetrahymena est soumis à une hydrolyse acide puis à une saponification en milieu hydroalcoolique. On extrait les insaponifiables, on acidifie et on extrait les acides gras libres.

Un échantillon de ceux-ci est méthylé avec une solution de BF_3 à 20% (poids/volume) dans le méthanol.

Les esters méthyliques sont analysés par chromatographie en phase gazeuse avec, comme standard interne le nonadécanoate de méthyle et des mélanges étalons et avec une colonne de polyéthylène glycol succinate.

C. - cultures en fermenteurs : des cultures en Erlenmeyer en phase logarithmique de croissance dans le milieu de base sont utilisées pour l'inoculation. Leur volume est de 5% à 10% du volume total du milieu dans le fermenteur et la population initiale est de $5-10 \times 10^3$ cellules/ml. Pour toutes les cultures en fermenteur, on a gardé un débit d'air stérile constant et égal à 1 volume/minute/volume de milieu de culture et une température de $28 \pm 0,2^\circ\text{C}$.

On a effectué les cultures dans les conditions d'agitation suivantes : la vitesse périphérique des turbines possède, pour chaque fermenteur, une valeur minimum qui s'élève à 0.94 mètre/seconde pour le fermenteur de 20 litres et à 1.69 mètres/seconde pour le fermenteur de 100 litres. Lors des cultures, la vitesse est réglée de telle sorte qu'elle garde sa valeur minimum jusqu'à ce que la concentration en O_2 dissous devient inférieure à 40%. Dans ce cas, elle augmente proportionnellement à l'écart.

D. Temps de génération et poids sec :

- La densité cellulaire est suivie par numération

10

électronique à l'aide d'un coulter counter modèle Z2 (orifice de l'électrode 200 μ m) après fixation à l'aldéhyde glutarique et le temps de génération est déterminé par regression linéaire.

- 05 - Le poids sec en Tetrahymena est mesuré après centrifugation à 800 g et à 2°C pendant 10 minutes d'un volume déterminé du milieu de culture suivie d'une lyophilisation du culot humide. Ces mesures du poids sec sont effectuées au début de la phase stationnaire de
- 10 croissance.

Exemple de culture effectuée et résultats obtenus.

Fermenteur de 20 litres

- volume utilisé : 15 litres

- 15 - pH initial = 5.5

on le laisse évoluer librement lors de la culture sans qu'il dépasse la valeur 7.0 ± 0.1 .

- deux ajouts de poudre de lait écrémé de 1% (p/v) chacun.

- 20 Le pH de départ est fixé à environ 5,5 par du H_2SO_4 , il diminue d'abord légèrement probablement par suite de l'augmentation de la concentration en CO_2 au début de la croissance puis augmente rapidement pour atteindre la valeur 7 où il sera fixé par le pompage automatique
- 25 d' H_2SO_4 2N.

Le temps moyenne de génération en minutes pour onze essais ($n=11; q=7$) est 118.

- L'ordre de grandeur de la densité cellulaire en phase stationnaire (cellules par/ml) est de 6,9
- 30 ($n=11; \sigma=0,24$). Le rendement par rapport au lactose en considérant que le poudre de lait contient 50% de lactose est de 40,1%.

L'analyse des acides gras figure au Tableau 1.

- Exemple 2 : Action des acides gras de Tetrahymena
- 35 sur l'agrégation plaquettaire in vitro.

Le principe de la méthode de mesure

L'exploration de l'agrégation plaquettaire a été effec-

tuée par une méthode photométrique. Elle consiste à ajouter, à du plasma enrichi en plaquettes, un inducteur d'agrégation dont les plus communs sont l'ADP, l'adrénaline (ou épinéphrine) et le collagène. Lorsqu'un agent
05 agrégant est ajouté au plasma, la transmission optique augmente avec la formation des agrégats plaquettaires et diminue lorsque survient la désagrégation. Cette méthode photométrique permet une observation qualitative et quantitative du phénomène d'agrégation et permet de dé-
10 celer certaines anomalies plasmatiques ou plaquettaires qui se traduisent par une absence d'agrégation (thrombopathies) ou par une hyperagrégation (thrombophilies).

Les deux vagues d'agrégation (la réversible) et l'irréversible) peuvent être suivies avec un appareil
15 photométrique, l'agrégomètre. Selon l'agent agrégant ajouté au plasma riche en plaquettes, l'une des deux phases peut manquer. Avec une préparation de collagène, par exemple, la première phase ou phase réversible est absente et la réponse est caractérisée par un temps de
20 latence suivi directement de la phase d'agrégation irréversible. Avec l'ADP, les deux phases sont généralement présentes et la réponse à l'agrégomètre est donc biphasique. Mais, selon la concentration en ADP ou selon le donneur de sang, la première phase d'agrégation peut ne
25 pas être suivie de la deuxième. Enfin, les deux phases peuvent ne pas être séparées dans le temps et ne sont alors pas distinguées à l'agrégomètre. L'incubation d'un plasma enrichi en plaquettes, avec un inhibiteur de l'une et/ou de l'autre des deux phases d'agrégation, mo-
30 difie la réponse plaquettaire à l'agent agrégant : le fait est décelé à l'agrégomètre. Un anti-agrégant inhibitant la deuxième phase d'agrégation, par exemple, atténue ou diminue, lors d'un test in vitro, la réponse au collagène et la deuxième courbe de la réponse à l'ADP.

Matériel et méthodes

Agrégomètre : l'agrégation plaquettaire est suivie, à $25 \pm 2^\circ\text{C}$, avec un appareil Born Aggregometer MK.III (du Pharmacological Research, Department of Pharmacology, Royal College of Surgeons, London - England) auquel est raccordé un enregistreur Perkin-Elmer Recorder 56. Un rayon lumineux monochromatique de 640 nm traverse une cuvette en verre siliconé (10 x 75 mm) contenant 1 ml de plasma sanguin enrichi en plaquettes (PRP). Un petit barreau magnétique, recouvert de polyéthylène et effectuant 1150 tours/minute, assure l'agitation du plasma dans la cuvette. Le PRP représente le 0% de transmission optique et un plasma pauvre en plaquettes (PPP) représente le 100% de transmission. L'addition d'un agent agrégant (ADP ou collagène) au PRP est suivie d'une variation de la transmission optique. Cette variation est enregistrée pendant 6 minutes, conformément au mode opératoire classique.

Donneurs de sang : Sept donneurs de sang du sexe masculin, âgés de moins de 35 ans, à jeûn depuis au moins 9 heures et sans aucun traitement médical.

PRP et PPP : tous les ustensiles utilisés sont en verre siliconé ou en plastique. Le sang est prélevé sur citrate : 1 volume de citrate à 3,8% (poids/volume) dans de l'eau distillée pour 9 volumes de sang.

Le PRP est obtenu par centrifugation du sang à 300 g pendant 9 minutes. Les plaquettes du surnageant sont comptées à l'aide d'un coulter counter (modèle ZF, orifice de l'électrode 70 microns) et si le nombre est supérieur à 300.000 plaquettes/mm³, il est ajusté à cette valeur par dilution avec du PPP.

Le PPP est obtenu par centrifugation du sang à 2000 g pendant 10 minutes.

Les PRP et PPP sont conservés à la température du laboratoire durant l'analyse.

Agents agrégants : De l'ADP (Boehringer) est dilué avec un tampon Michaëlis (Stago, pH = 7,3) jusqu'à

13

une concentration de 5 μ g/ml.

Du collagène (Stago) est dilué avec le tampon Michaëlis jusqu'à une concentration de 400 μ g/ml. On incube au bain-marie à 37°C pendant 10 minutes pour polymériser le collagène.

Les solutions d'ADP et de collagène sont conservées dans la glace fondante pendant l'analyse.

Produits testés : les produits sont dissous dans le benzène (Merck, pour analyse) et conservés sous azote jusqu'à utilisation;

- γ -linolénate de méthyle ou 18:3 $\Delta^6,9,12$ (Sigma, n° = 5377)

- mélanges de γ -linolénate de méthyle et d'acétate de méthyle et d'acétate d' α -tocophérol (Roche-vitamine E).

- mélange d'acides gras de Tetrahymena rostrata dont la composition est donnée à l'exemple 1, tableau 1 ($\text{pH} \leq 7.0 \pm 0.1$).

- Les tests d'agrégation plaquettaire sont effectués dans les quatre heures qui suivent le prélèvement du sang.

Pour un test à blanc, on procède comme suit :

- 1 ml de PPP = 100% de transmission optique
- 1 ml de PRP = 0% de transmission optique
- addition au PRP de 50 μ l de la solution d'ADP ($\rightarrow 0,25$ μ g d'ADP/ml de PRP) ou de 100 μ l de la solution de collagène ($\rightarrow 40$ μ g de collagène/ml de PRP) et on enregistre la réponse pendant 6 minutes.

Pour chaque agent agrégant, ce test est répété à intervalles réguliers (2 à 4 fois) durant l'analyse.

Les tests de l'action d'un produit sur l'agrégation.

Le même procédé est utilisé, mais, dans ce cas, le ml de PRP est préalablement incubé, pendant 30 minutes et sous agitation, avec la quantité désirée du produit à tester. Le benzène dans lequel était dissous le produit, est soigneusement éliminé de la cuvette et avant incubation,

14

par un flux d'azote. Pour chaque donneur de sang, un test est effectué, au préalable, avec le résidu de l'évaporation à sec de 1 ml de benzène : les réponses obtenues sont analogues à celles obtenues avec les tests à blanc.

Expressions des résultats :

- Les résultats de l'agrégation au collagène sont exprimés par l'agrégation à 6 minutes de la vague d'agrégation unique B obtenue;

Les tests à blanc, avec 0,25 μ g d'ADP/ml, ont présenté, pour tous les donneurs, à l'exception du donneur 2, les deux vagues d'agrégation : la réversible A et l'irréversible B. Les résultats seront exprimés par l'agrégation maximum de la première vague A et par l'agrégation à 6 minutes de la deuxième vague B. Pour le donneur 2, les deux vagues ne sont pas séparées dans le temps et les résultats ont été exprimés par l'intensité de l'agrégation à 6 minutes.

Dans tous les cas, l'agrégation en première ou en deuxième phase, exprimée en %, représente la différence de transmission optique entre le PRP (0%) et respectivement le point le plus élevé de la vague A et le point atteint à la 6ème minute pour la vague B.

Réponses normales et % d'inhibition de l'agrégation

On entend par "réponses normales", les résultats enregistrés en présence d'un agrégant, mais en l'absence de la substance à tester. Pour chaque agent agrégant, les tests "à blanc", effectués à intervalles réguliers durant l'analyse, nous permettent de calculer la réponse "normale" de chaque donneur de sang.

L'agrégation obtenue avec le même agent agrégant, mais en présence de l'un des produits testés, est comparée à celle de la réponse normale.

L'exemple suivant illustre notre méthode de calcul : pour le premier donneur du sang, deux tests "à blanc" avec 40 μ g de collagène/ml de PRP ont fourni des

15
 agrégations à 6 minutes, respectivement de 81,7%
 (fig.44) et de 71,7% (fig.47). La "réponse normale" au
 collagène est caractérisée par une agrégation de 76,7%
 (moyenne x des deux résultats) avec un écart-type σ de
 05 $\sigma \times 100$
 7,1% ce qui correspond, d'après l'équation $E = \frac{\sigma \times 100}{x}$, à

$$10 \quad E = \frac{7,1 \times 100}{76,7} = 9,2\%$$

Pour le même donneur de sang et avec 1 mg d'acide
 oléique/ml de PRP, on obtient, et pour la même concen-
 tration en agent agrégant, une agrégation de 33,7%. Le %
 15 d'inhibition de l'agrégation au collagène est donc de :

$$20 \quad \frac{(76,7 - 33,7) \times 100}{76,7} = 56,1\%$$

Cette valeur est supérieure à E et est donc
 significative.

Résultats et discussions

25 Le tableau 2 fournit, pour chaque donneur de
 sang, la concentration des plaquettes dans le PRP et les
 "réponses normales" (avec les valeurs de E) au collagène
 (40 μ g/ml) et à l'ADP (0,25 μ g/ml).

30 Chacun des tableaux suivants donne, par produit
 testé, et sur la base des figures précédentes, les %
 d'inhibition des agrégations induites respectivement par
 le collagène et par l'ADP.

Notons que ceux-ci varient souvent considéra-
 blement, pour le même produit et pour la même concentra-
 tion, d'un PRP à un autre.

35 1) γ -linoléate de méthyle (tableau 3)

Il a été constaté que le γ -linoléate de méthyle
 est un inhibiteur de l'agrégation plaquettaire et inhibe
 préférentiellement la deuxième vague d'agrégation à

l'ADP ou la vague d'agrégation unique B au collagène.

- Avec une concentration de 1 mg/ml, l'inhibition de l'agrégation au collagène est variable d'un sujet à un autre. Mais, à cette concentration l'inhibition est
05 significative (et assez importante) chez quatre PRP (des cinq testés). L'inhibition moyenne (sur les cinq) est d'environ 42%.

Pour la même concentration, l'inhibition de la deuxième vague d'agrégation à l'ADP est présente chez
10 quatre PRP (sur les cinq testés) et la moyenne se situe à environ 55%. L'inhibition de la première vague d'agrégation est présente, mais faiblement, chez deux PRP, et est non significative chez les deux autres. Elle n'a pas pu être mesurée chez le cinquième (donneur
15 2). La moyenne (chez quatre PRP) est très peu significative et se situe à environ 10%.

- Pour une concentration de 6 mg/ml, l'inhibition de l'agrégation au collagène se situe, en moyenne, à environ 52% et seule l'agrégation d'un PRP sur quatre n'a
20 pas été inhibée d'une manière significative.

À cette même concentration, les tests d'agrégation à l'ADP montrent que la deuxième vague d'agrégation est inhibée, en moyenne (pour les deux PRP testés) d'environ 65% et la première vague est inhibée d'environ
25 29%.

On constate que l'inhibition de la vague B ne varie pas d'une manière significative en augmentant la concentration de 1 à 6 mg/ml et que, même à ces concentrations élevées, l'inhibition n'est pas totale. Pour
30 expliquer ces effets, l'hypothèse suivante peut être avancée : le γ -linolénate n'est, en lui-même, ni un substrat de la cyclooxygénase, ni un inhibiteur de celle-ci ; son action antiagrégante serait due à l'augmentation, dans les plaquettes sanguines, de la proportion d'acide dihomogamma-linoléique (antiagrégant) par
35 rapport à l'arachidonique (agrégant), deux acides dont il est le précurseur biologique. Sur la base de cette

hypothèse, on peut supposer que la biosynthèse du dihomogamma-linoléique (à partir du gamma-linoléique) est plus rapide que sa transformation en arachidonique et qu'un équilibre (dynamique), caractérisé par une augmentation du rapport des concentrations dihomogamma-linoléique / arachidonique, s'installe dans les plaquettes.

La concentration en acide gamma-linoléique et le temps nécessaires pour atteindre cet équilibre varient d'un sujet à l'autre. Il est possible que cette concentration puisse être inférieure à 1 mg/ml, ce qui expliquerait les réponses analogues observées avec les concentrations de 1 et de 6 mg/ml. De même, l'équilibre en question, qui suppose une réduction importante de la quantité d'acide arachidonique présente dans les plaquettes, n'élimine toutefois pas complètement cet acide. Ceci empêcherait une inhibition totale de l'agrégation.

Selon les résultats obtenus et le mode d'action proposé, on peut conclure que l'introduction, dans la nourriture, d'une source riche en acide gamma-linoléique, ou l'acide lui-même, doit prévenir les maladies thrombotiques en augmentant la proportion du dihomogamma-linoléique par rapport à l'arachidonique et en réduisant ainsi la phase d'agrégation irréversible des plaquettes face aux différents agents agrégants.

2) Mélanges de gamma-linolénate et d'acétate d'alpha-tocophérol (tableau 4)

En mélangeant, dans la nourriture, une source riche en acide gamma-linoléique (ou l'acide gamma-linoléique lui-même) avec de la vitamine E, le pouvoir antiagrégant de cette source est augmenté. La vitamine E a aussi, dans le mélange, un autre rôle : empêcher comme antioxydant, la dégradation des acides insaturés dont, surtout, le gamma-linoléique.

3) Acides gras totaux de Tetrahymena (tableau 5)

Ce mélange d'acides gras est, parmi toutes les

substances testées, l'antiagrégant le plus puissant.

- Pour le test au collagène, l'inhibition de l'agrégation demeure significative à une concentration de 57 $\mu\text{g/ml}$ où elle atteint une moyenne d'environ 23%.
- 05 À cette concentration seuls deux PRP (sur les cinq testés) n'ont pas présenté une influence significative, tandis que l'inhibition de l'agrégation d'un PRP (donneur 6, figure 59) atteignait environ 67%. En doublant cette concentration, on a, à peu près, doublé l'inhibition :
- 10 celle-ci atteignait en moyenne et pour les cinq PRP testés, environ 41%. À une concentration de 230 $\mu\text{g/ml}$, l'inhibition a atteint une moyenne de 54%, mais pour deux PRP (donneurs 5 et 6), elle était supérieure à 80% (voir les figures) à des concentrations supérieures
- 15 à 575 $\mu\text{g/ml}$, l'inhibition est, en moyenne, supérieure à 70%.

- Pour le test à l'ADP, l'inhibition de la première vague de l'agrégation n'est, en moyenne, significative qu'à partir des concentrations supérieures à 230
- 20 $\mu\text{g/ml}$ où elle atteint environ 15%. L'inhibition de la deuxième vague d'agrégation à l'ADP atteint environ 30% à 57,5 $\mu\text{g/ml}$, environ 50% à 115 $\mu\text{g/ml}$ et devient supérieure à 70% à partir de 575 $\mu\text{g/ml}$.

- On constate que l'inhibition affecte principalement la vague B (irréversible) et qu'il faut dépasser
- 25 une concentration en acides gras supérieure à 230 $\mu\text{g/ml}$ pour déceler une inhibition significative de la première vague d'agrégation.

- Le mélange d'acides gras de *T. rostrata* contient
- 30 (en poids) environ 30% d'acide γ -linolénique et environ 10% d'acide oléique. Ces deux acides, pris séparément, ne présentent que des inhibitions très faibles comparativement au mélange d'acides gras de *Tetrahymena* et la simple sommation de ces trois inhibitions par paires (en
- 35 tenant compte, par exemple, des teneurs respectives et des résultats des tableaux 2 et 3) ne peut, en tout cas, pas expliquer le puissant pouvoir antiagrégant du mélan-

ge. Pour tenter d'expliquer ce pouvoir, plusieurs hypothèses peuvent être avancées :

1. Une "synergie" existe entre l'action du γ -linoléique et celle de l'oléique et/ou du ciliénique.
- 05 2. La présence de l'acide ciliénique ($\pm 7\%$ du poids des acides gras totaux) dont l'action n'est pas connue.
3. Action d'autres acides (ou de mélanges d'acides) présents dans ce mélange (voir tableau 1; $\text{pH} \leq 7,0$
10 $\pm 0,1$).

De ces hypothèses, la première paraît la plus plausible.

- On sait que l'acide oléique est un inhibiteur de la cyclooxygénase : il se fixe sur l'enzyme sans pour
15 autant être un substrat de celui-ci. Les acides dihomogamma-linoléique et arachidonique en sont, par contre, des substrats. En présence des trois acides, il y a compétition. La concentration de chacun d'eux ainsi que les affinités respectives de l'enzyme déterminent l'acide
20 de qui sera préférentiellement fixé. On peut supposer que l'affinité de la cyclooxygénase pour le dihomogamma-linoléique est la plus importante et que la compétition, en présence des trois acides, se fait principalement entre l'arachidonique et l'oléique. Dans ce cas, l'effet
25 antiagrégant dû à l'augmentation de l'acide dihomogamma-linoléique serait augmenté d'un autre effet antiagrégant : celui dû à l'inhibition par l'acide oléique de la fixation de l'acide arachidonique sur la cyclooxygénase.

- L'intervention éventuelle de l'acide ciliénique
30 aurait une explication identique ou analogue.

- L'inhibition de la première vague d'agrégation à l'ADP, observée pour des concentrations de mélange supérieures à $230 \mu\text{g/ml}$, est probablement due, comme on l'a souligné pour le cas du γ -linoléique, à une formation de
35 PGE_1 avant l'addition de l'agent agrégant.

Ainsi donc, le mélange des acides gras de Tetrahymena constitue en lui-même un puissant agent antiagrégant.

20
gant. Son pouvoir dépasse, de loin, ceux des acides
 γ -linolénique et oléique pris séparément. Aucune huile
ou mélange d'acides gras connu ne présente, à la con-
naissance des Demanderesses, un effet aussi puissant sur
05 l'agrégation plaquettaire in vitro.

Tableau 1 : Composition en acides gras des *Tetrahymena* par GLC (% en poids par rapport aux acides gras totaux). Moyennes des résultats obtenus avec trois cultures (n = 3).

05	Acides gras Structure	T.rostrata
10	12:0 acide laurique	3,1% $\sigma = 0,9\%$
	14:0 acide myristique	5,8% $\sigma = 1,4\%$
15	16:0 acide palmitique	5,7% $\sigma = 0,8\%$
20	16:1 Δ^9 acide palmitoléique	6,3% $\sigma = 0,6\%$
	16:2 $\Delta^{6,9}$	6,1% $\sigma = 0,4\%$
25	16:2 $\Delta^{9,12}$	0,9% $\sigma = 0,2\%$
	18:0 acide stéarique	3,8% $\sigma = 0,5\%$
30	18:1 Δ^9 acide oléique	11,2% $\sigma = 0,8\%$
	18:2 $\Delta^{6,11}$ acide ciliénique	7,7% $\sigma = 0,7\%$
35	18:2 $\Delta^{9,12}$ acide linoléique	11,6% $\sigma = 0,7\%$

2574089

22

Suite du Tableau 1 :

05

18:3 Δ 6,9,12 acide γ -linoléinique	29,8% σ = 1,8%
20:1 Δ 11	3,8% σ = 0,3%

Tableau 2 : Concentration des plaquettes dans les PRP et réponses normales des différents donneurs de sang.

Donneur de sang	Concentration des plaquettes dans le PRP (plaquettes / mm ³) (a)	Collagène (40 µg/ml) (b)		ADP (0,25 µg/ml) (b)	
		Nombre de tests	Agrégation à 6 minutes (vague B) en % et (E)	Nombre de tests	Agrégation maximum en % de la première vague et (E) Agrégation à 6 minutes vague B en % et (E)
1	270 x 10 ³	2	76,7 (9,2)	-	-
2	365 x 10 ³	-	-	4	-(c) 58,4(10,6)
3	450 x 10 ³	4	83,4 (8,4)	4	43,1(9,3) 62,8(12,1)
4	496 x 10 ³	2	72,2 (4,8)	4	58,4(5,5) 56,7(15,3)
5	372 x 10 ³	3	84,1 (12,0)	3	67,6(10,7) 73,1(11,6)
6	370 x 10 ³	4	72,9 (8,9)	4	47,7(8,3) 76,8(8,7)
7	460 x 10 ³	4	75,6 (10,2)	4	57,3(7,2) 66,9(12,0)

(a) Les PRP qui présentent des concentrations supérieures à 300.000 plaquettes/mm³ seront ajustés à cette valeur, pour les différents tests, par dilution avec du PRP

(b) Ce tableau donne, pour chaque facteur, la moyenne des valeurs obtenues dans les tests à blanc écart-type x 100

et E =

valeur moyenne

(c) Pour le donneur 2, les deux vagues d'agrégation à l'ADP ne sont pas séparées dans le temps

Tableau 3 : Inhibition de l'agrégation plaquettaire par le γ -linolénate de méthyle (a) (b) (c)

05	$\mu\text{g/ml}$	collagène 40 $\mu\text{g/ml}$	ADP 0,25 $\mu\text{g/ml}$	
		% d'inhibition de la vague B (donneur)	% d'inhibition de l'agrégation maximum de la première vague (donneur)	% d'inhibition de la vague B (donneur)
10	6000	86,0 (4)	46,7 (4)	89,4 (4)
		36,4 (5)	11,6 (5)	40,6 (5)
		86,0 (6)	-	-
		9,1 (7) (x)	-	-
15		M = 52,1	M = 29,1	M = 65,0
20	1000	42,3 (1)	-	-
		-	-(2)	42,5 (2)
		76,7 (4)	24,7 (4)	88,2 (4)
		24,5 (5)	8,4 (5) (x)	10,9 (5) (x)
25		68,2 (6)	7,3 (6) (x)	75,2 (6)
		10,0 (7) (x)	15,4 (7)	67,1
		M = 42,3	M = 10,0	M = 54,6

(x) % d'inhibition non significatifs

30 (a) N.S. = valeurs non significatives sur la base des valeurs de E du tableau 1.

(b) M = moyenne des valeurs (les valeurs non significatives sont considérées comme nulles). M est non significative si elle est inférieure ou égale à la moyenne des E.

35 (c) Pour le donneur 2, les deux vagues d'agrégation à l'ADP ne sont pas séparées dans le temps et on mesure seulement l'inhibition de l'agrégation à 6 minutes.

Tableau 4 : Inhibition de l'agrégation plaquettaire par les mélanges de γ -linolénate de méthyle et d'acetate d' α -tocophérol (a) (b) (c).

05		collagène 40 $\mu\text{g/ml}$	ADP 0,25 $\mu\text{g/ml}$
10	$\mu\text{g/ml}$	% d'inhibition de la vague B (donneur)	% d'inhibition de l'agrégation maximum de la première vague (donneur)
15			
20	Acétate : 142	84,3 (4) 85,0 (5)	38,3 (4) 37,7 (5)
25	γ -linolé- nate : 1000	83,7 (6) M = 84,3	- M = 38
30	Acétate : 71	79,6 (1) -	- 59,9 (2)
35	γ -linolé- nate : 1000	82,1 (5) 71,2 (6) 9,1 (7)(x) M = 58,2	36,3 (5) 15,4 (6) 43,3 (7) M = 31,7
			72,3 (5) 84,2 (6) 86,8 (7) M = 75,8

(x) % d'inhibition non significatifs

(a) (b) (c) : voir notes tableau 3.

Tableau 5 : Inhibition de l'agrégation plaquettaire par les acides gras de T.rostrata (a) (b) (c).

		collagène 40 µg/ml	ADP 0,25 µg/ml	
	µg/ml	% d'inhibition de la vague B (donneur)	% d'inhibition de l'agrégation maximum de la première vague (donneur)	% d'inhibition de la vague B (donneur)
05				
10	2300	92,5 (1)	-	-
		-	-	93,3 (2)
15		86,7 (4)	100 (4)	79,5 (4)
		M = 89,6		M = 86,4
20	1150	81,1 (3)	85,7 (3)	100 (3)
		86,3 (4)	40,4 (4)	76,0 (4)
		88,6 (5)	75,8 (5)	85,4 (5)
		89,8 (6)	80,9 (6)	83,8 (6)
		59,7 (7)	43,3 (7)	87,3 (7)
		M = 81,1	M = 65,1	M = 86,9
25	575	69,7 (3)	45,3 (3)	84,3 (3)
		84,9 (4)	43,3 (4)	78,7 (4)
		91,0 (5)	22,8 (5)	47,9 (5)
		89,8 (6)	30,5 (6)	92,1 (6)
		28,6 (7)	41,5 (7)	67,5 (7)
30		M = 72,8	M = 36,7	M = 74,1
35	230	28,6 (3)	11,4 (3)	44,5 (3)
		55,9 (4)	13,3 (4)	81,7 (4)
		88,0 (5)	6,9 (5)(x)	10,1 (5)
		84,5 (6)	16,6 (6)	86,3 (6)
		13,4 (7)	35,4 (7)	55,5 (7)
		M = 54,1	M = 15,3	M = 53,6

Suite du Tableau 5 :

05	115	12,4 (3)	-	-
		33,0 (4)	11,2 (4)	77,7 (4)
		77,6 (5)	6,0 (5)(x)	3,2 (5)(x)
		83,7 (6)	2,7 (6)(x)	78,4 (6)
		-2,5 (7)(x)	20,6 (7)	44,3 (7)
		M = 41,3	M = 7,9 (x)	M = 50,1
10	57,5	4,3 (3)(x)	8,7 (3)(x)	12,3 (3)
		15,2 (4)	4,0 (4)(x)	49,0 (4)
		31,9 (5)	2,8 (5)(x)	0,2 (5)(x)
		67,4 (6)	1,0 (6)(x)	69,0 (6)
		-1,9 (7)(x)	15,8 (7)	21,9 (7)
		M = 22,9	M = 3,2 (x)	M = 30,4
15				

(x) % d'inhibition non significatifs

(a) (b) (c) : voir notes tableau 3.

REVENDEICATIONS.

1. Procédé de production d'acides gras caracté-
sé en ce qu'il comporte au moins les étapes de
- culture en masse de protozoaires ciliés *Tetrahymena*
05 dans un milieu nutritif adéquat et
- l'extraction des acides gras totaux de *Tetra-*
hymena.
2. Procédé selon la revendication 1 caractérisé
en ce qu'on utilise l'espèce *T.rostrata* de *Tetrahymena*.
- 10 3. Procédé selon la revendication 1 ou 2 caracté-
risé en ce que la production de *Tetrahymena* s'effectue
en fermenteur en utilisant un milieu de culture à base
de lait écrémé et de levure ou d'extrait de levure.
4. Produit obtenu par le procédé selon l'une
15 quelconque des revendications 1 à 3.
5. Produit selon la revendication 4 caractérisé
en ce qu'il est constitué à raison d'au moins 20% d'aci-
de γ -linolénique ou d'acide dihomog γ -linolénique ou de
ses dérivés, éventuellement mélangé avec 1 à 15% en
20 poids d'acide oléique et 1 à 10% d'acide ciliénique.
6. Produit selon la revendication 5 caractérisé
en ce qu'il contient l'acide γ -linolénique ou l'acide
dihomog γ -linolénique sous forme d'acide libre ou sous
forme d'un dérivé notamment d'ester, de préférence un
25 ester méthylique.
7. Préparation médicamenteuse ou alimentaire à
action d'antiagrégation plaquettaire ou antithrombotique
caractérisée en ce qu'elle contient comme constituant
actif au moins de l'acide γ -linolénique ou l'acide
30 dihomog γ -linolénique ou ses dérivés, notamment ses es-
ters, de préférence l'ester méthylique.
8. Préparation médicamenteuse ou alimentaire
caractérisée en ce qu'elle contient l'acide
 γ -linolénique en mélange avec de l'acide oléique et/ou
35 de l'acide ciliénique.
9. Préparation médicamenteuse ou alimentaire se-
lon la revendication 7 ou 8 caractérisée en ce qu'elle
comporte comme adjuvant l'acétate d' α -tocophérol.

10. Préparation médicamenteuse ou alimentaire à action d'antiagregation plaquettaire ou antithrombotique caractérisée en ce qu'elle contient le produit selon la revendication 4.